doi:10.11659/jjssx.11E024094

·基础研究·

苦参碱对葡萄膜黑色素瘤作用机制的网络药理学研究及验证

张思瑶,董星星,袁 婷,练海东 (石河子大学第一附属医院眼科,新疆 石河子 832008)

[摘 要] **目的** 应用网络药理学探讨苦参碱治疗葡萄膜黑色素瘤的作用机制,并通过分子对接、细胞实验验证相关结果。**方法** 从Swiss Target Prediction、SuperPred、TCMSP数据库获得苦参碱的潜在靶点。从GeneCards、OMIM、CTD和DrugBank数据库获得葡萄膜黑色素瘤相关靶点。建立蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络来筛选核心靶点。对潜在靶点进行基因本体(GO)富集分析及京都基因和基因组百科全书(KEGG)信号通路分析。通过分子对接技术评估苦参碱和核心靶点之间的相互作用。基于CCK-8法评估不同浓度苦参碱(0.25 g/L、0.50 g/L、1.00 g/L、2.00 g/L)对葡萄膜黑色素瘤细胞增殖的影响。利用Western blot法验证不同浓度苦参碱(0.25 g/L、0.50 g/L、1.00 g/L、2.00 g/L)对PI3K-Akt信号通路的调控作用。**结果** 确定了208个苦参碱的潜在靶点,获取5 453个葡萄膜黑色素瘤相关靶点。PPI网络的拓扑分析揭示了8个核心靶点,分别为白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子(TNF)、髓细胞增生蛋白(MYC)、信号转导及转录激活蛋白3(STAT3)、胱天蛋白酶3(CASP3)、热休克蛋白90AB1(HSP90AB1)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)、基质金属蛋白酶9(MMP9)。GO富集分析显示,生物过程(BP)主要包括炎症反应、蛋白质磷酸化和对外源性刺激的反应等;细胞组分(CC)主要包括质膜、细胞表面和细胞质等;分子功能(MF)主要包括相同蛋白质结合、ATP结合及激酶活性等。KEGG通路富集分析表明,苦参碱的作用是由病毒致癌机理、癌症通路、TNF信号通路和PI3K-Akt信号通路介导的。分子对接显示,苦参碱与筛选的核心靶点之间具有良好的结合能力。细胞实验结果显示:浓度为0.50 g/L、1.00 g/L、2.00 g/L的苦参碱均能够抑制MuM2B细胞的增殖,且随着浓度的增加,细胞存活率逐渐降低。浓度为0.50 g/L、1.00 g/L、2.00 g/L的苦参碱均可以下调p-PI3K和p-Akt的蛋白表达水平,且随着浓度的增加,p-PI3K和p-Akt的蛋白表达水平逐渐下降。**结论** 苦参碱作用于IL-6、TNF、MYC、STAT3、CASP3、HSP90AB1、mTOR和MMP9等靶点,通过病毒致癌机理、癌症通路、TNF信号通路和PI3K-Akt信号通路发挥治疗葡萄膜黑色素瘤的作用。

[关键词] 苦参碱;葡萄膜黑色素瘤;作用机制;网络药理学;分子对接;细胞实验
[中图分类号] R773.9 [文献标志码] A [收稿日期] 2024-11-18

Network pharmacological study and verification of the mechanism of matrine on uveal melanoma

ZHANG Si-yao, DONG Xing-xing, YUAN Ting, LIAN Hai-dong (Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Shihezi University, Shihezi Xinjiang 832008, China)

Abstract: Objective To explore the mechanism of matrine in the treatment of uveal melanoma by network pharmacology, and the related results were verified by molecular docking and cell experiments. **Methods** The potential targets of matrine were obtained from Swiss Target Prediction, SuperPred and TCMSP databases. The targets related to uveal melanoma were obtained from GeneCards, OMIM, CTD and DrugBank databases. Protein-protein interaction (PPI) network was established to screen core targets. Gene ontology (GO) enrichment analysis and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) signal pathway analysis were carried out for potential targets. The interaction between matrine and core targets was evaluated by molecular docking technique. The effects of different concentrations of matrine (0.25 g/L, 0.50 g/L, 1.00 g/L, 2.00 g/L) on the proliferation of uveal melanoma cells were evaluated based on CCK-8 method. Western blot was used to verify the regulatory effects of different concentrations of matrine (0.25 g/L, 0.50 g/L, 1.00 g/L, 2.00 g/L) on PI3K-Akt signaling pathway. **Results** A total of 208 potential targets of matrine were identified, and 5 453 targets related to uveal melanoma were obtained. The topological analysis of PPI network revealed 8 core targets, namely interleukin -6 (IL-6), tumor necrosis factor (TNF), myelocytomatosis proteins (MYC), signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), caspase-3 (CASP3), heat shock protein 90AB1 (HSP90AB1), mammalian target of rapamycin (mTOR), and matrix metalloproteinase 9 (MMP9). GO enrichment analysis showed that biological processes (BP) mainly included inflammatory response, protein phosphorylation and response to exogenous stimuli; cell components (CC) mainly included plasma membrane, cell surface and cytoplasm; molecular function (MF) mainly included the same protein binding, ATP binding and kinase activity. The enrichment analysis of KEGG pathway showed that the effect of matrine was mediated by viral carcinogenesis, cancer pathway, TNF signaling pathway and PI3K-Akt signaling pathway. Molecular docking showed that matrine had good binding ability with the selected core targets. The results of cell experiments showed that matrine at concentrations of 0.50 g/L, 1.00 g/L

[通信作者] 练海东,E-mail:lianhaidong0229@163.com

and 2.00 g/L could inhibit the proliferation of MuM2B cells, and the cell survival rate gradually decreased with the increase of concentration. Matrine at concentrations of 0.50 g/L, 1.00 g/L and 2.00 g/L could down-regulate the protein expression levels of p-PI3K and p-Akt, and the protein expression levels of p-PI3K and p-Akt gradually decreased with the increase of concentration. **Conclusion** Matrine acts on targets such as IL-6, TNF, MYC, STAT3, CASP3, HSP90AB1, mTOR, MMP9, and exerts therapeutic effects on uveal melanoma by viral carcinogenesis, cancer pathway, TNF signaling pathway and PI3K-Akt signaling pathway, etc.

Keywords: matrine; uveal melanoma; mechanism of action; network pharmacology; molecular docking; cell experiment

葡萄膜黑色素瘤是成年人中最常见的一种原发性眼内恶性肿瘤,起源于葡萄膜(虹膜、睫状体、脉络膜)的黑色素细胞,其中90%发病于脉络膜,年发病率为0.002%~0.008%[1-2]。葡萄膜黑色素瘤起病隐匿,患者就诊时往往已发展到晚期,且极易发生肝转移,严重危害患者生命及视功能。其治疗方法包括质子照射、放射敷贴治疗、免疫治疗、肿瘤局部切除、眼球摘除等,但均存在一定局限性,如长期用药导致患者经济负担大、疗效差,甚至引起第二恶性肿瘤等[3]。目前,对于葡萄膜黑色素瘤缺乏有效的治疗手段,患者的预后和生存率较差。

苦参碱是传统中药苦参的重要药理活性成分,具有抗菌消炎、调节免疫、抗病毒、抗肿瘤等作用。既往研究发现,苦参碱可通过抑制细胞增殖、阻滞细胞周期、诱导凋亡以及逆转耐药等机制发挥抗肿瘤作用,在肝癌、乳腺癌、宫颈癌、胃癌中均有应用[4]。王振华等[5]研究表明,苦参碱通过下调CyclinD、Bcl-2表达,上调Bax表达,促进人葡萄膜黑色素瘤细胞凋亡,抑制细胞增殖。但其具体机制尚不十分清楚。网络药理学是现今确定药物靶点的一条重要途径,是从系统生物学和生物网络平衡角度揭示药物整体调节作用机制,从而指导临床治疗的一门新兴学科。因此,本研究借助网络药理学的方法,探讨苦参碱对葡萄膜黑色素瘤的作用靶点,并在此基础上构建"药物-靶点-疾病"网络图,深入研究其核心靶点并预测作用机制,最后运用分子对接、细胞实验进行验证,为后续进一步探索苦参碱治疗葡萄膜黑色素瘤相关作用机制提供更多思路,也为苦参碱在临床中的应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 网络药理学

1.1.1 数据库及软件 PubChem数据库(http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/),Swiss Target Prediction数据库(http://www.swisstargetprediction.ch/),SuperPred数据库(http://prediction.charite.de/),TCMSP数据库(http://ibts.hkbu.edu.hk/LSP/tcmsp.php),GeneCards数据库(http://www.gene-cards.org/),OMIM数据库(http://www.omim.org/),CTD数据库(http://ctdbase.org/),DrugBank数据库(https://www.drugbank.ca/),绘制韦恩图数据库(http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/),STRING 12.0蛋白质相互作用信息数据库(https://string-ilh.org/),DAVID数据库(https://david.ncif-crf.gov/home.jsp/)。Cytoscape 3.9.0软件,AutoDock Tools 1.5.6软件,AutoDockVina 4.2软件,PyMOL 2.5.4软件,LigPlus软件。

1.1.2 苦参碱结构获得及相关靶点预测 通过PubChem数据库获得苦参碱的二级结构。通过Swiss Target Prediction(probability>0)、SuperPred(probability>50%)、TCMSP数据库筛选整合苦参碱的潜在靶点。

1.1.3 葡萄膜黑色素瘤相关基因构建及韦恩图绘制 从GeneCards、OMIM、CTD和DrugBank数据库,以"葡萄膜黑色素瘤"为关键词筛选葡萄膜黑色素瘤相关疾病的靶点,通过去掉重复靶点建立疾病相关基因。将苦参碱的靶点与葡萄膜黑色素瘤的靶点取交集,得到苦参碱治疗葡萄膜黑色素瘤的潜在靶点,并绘制韦恩图。

1.1.4 蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction,PPI)网络构建 将苦参碱治疗葡萄膜黑色素瘤的潜在靶点输入STRING 12.0蛋白质相互作用信息数据库构建PPI网络。此外,引入Cytoscape 3.9.0软件至PPI网络以筛选核心靶点。

1.1.5 "药物-靶点-疾病"网络图的构建 将苦参碱治疗葡萄膜黑色素瘤的潜在靶点导入Cytoscape 3.9.0软件构建"药物-靶点-疾病"网络图。

1.1.6 基因本体(gene ontology,GO)功能与京都基因和基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,KEGG)富集分析 利用DAVID数据库对苦参碱治疗葡萄膜黑色素瘤的潜在靶点进行GO功能和KEGG信号通路富集分析。

1.2 分子对接

利用AutoDock Tools 1.5.6和AutoDockVina 4.2软件将苦参碱与来自核心靶点的8种蛋白质进行分子对接。PyMOL 2.5.4和LigPlus软件用于可视化和分析苦参碱与核心靶点的相互作用以及结合模式。

1.3 细胞实验

1.3.1 细胞、试剂与仪器 人脉络膜黑色素瘤MuM2B细胞株购于中国科学院细胞研究所。苦参碱纯品(北京康纳瑞生物科技有限公司),DMEM培养基(上海英潍捷基上海贸易有限公司),CCK-8试剂盒(美国Selleck公司),10%胎牛血清白蛋白(广州特科思广州科技服务有限公司),抗p-PI3K、p-Akt和内参β-actin抗体及对应二抗(巴傲德生物科技有限公司),二喹啉甲酸(diquinoline carboxylic acid, BCA)蛋白定量试剂盒(美国Pierce公司)。Eon多功能酶标仪。

1.3.2 细胞培养与分组 将MuM2B细胞复苏后,于DMEM培养基中培养,置于37 ℃、5% CO_2培养箱中,观察细胞形态,3 d更换1次培养液,当生长密度在90%左右时,进行传代,取对数生长期的细胞进行实验。细胞以浓度1×10^6/mL接种于96孔板中,每孔100 μL,孵育24 h后分别加入浓度为0.25 g/L、0.50 g/L、1.00 g/L、2.00 g/L的苦参碱,分为4组(苦参碱0.25 g/L、苦参碱0.50 g/L、苦参碱1.00 g/L、苦参碱2.00 g/L),每组均设5个复孔;另设置5孔不加苦参碱作为对照组,培养条件与其他4组一致。

1.3.3 CCK-8法检测苦参碱对葡萄膜黑色素瘤细胞MuM2B的影响 各组MuM2B细胞经不同浓度苦参碱(0.25 g/L、0.50 g/L、1.00 g/L、2.00 g/L)处理48 h后,每孔加入10 μL的CCK-8溶液,孵育2 h。在多功能酶标仪450 nm波长下检测吸光度值。

1.3.4 Western blot法测定p-PI3K、p-Akt的蛋白表达水平 各组MuM2B细胞经不同浓度苦参碱处理48 h后,收集细胞,常规方法提取蛋白质,BCA法进行蛋白定量,上样量50 μg,聚丙烯酰胺凝胶电泳中上样电泳,电转移至PVDF膜,10%胎牛血清白蛋白室温封闭2 h,洗膜后与特定一抗4 ℃孵育过夜。洗膜后加入二抗,室温孵育2 h,洗膜,化学发光试剂盒显色,以β-actin为内参,凝胶成像系统扫描分析蛋白条带,计算目的蛋白相对表达量。

1.4 统计学方法

使用SPSS 25.0统计学软件分析数据,计量资料用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,2组间比较采用t检验。$P<0.05$为差异有统计学意义。

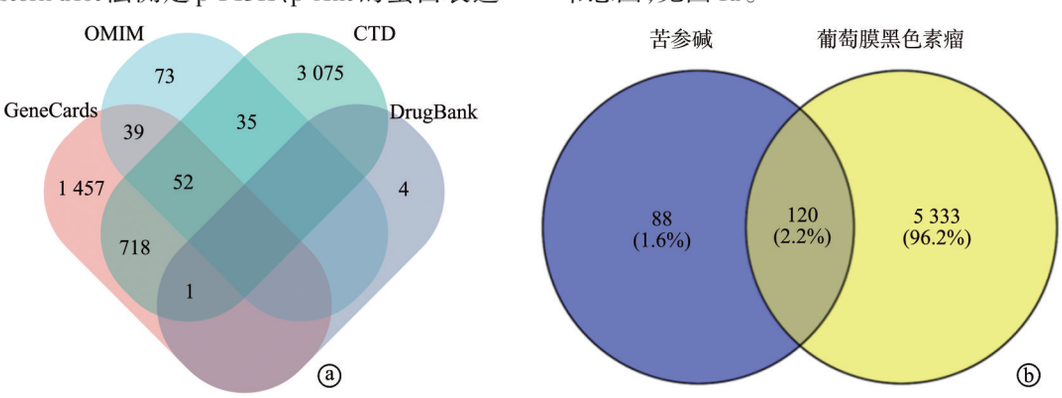
2 结果

2.1 获得苦参碱结构及相关靶点预测

从PubChem数据库下载苦参碱的化学结构,其PubChem CID为91 466。使用Swiss Target Prediction、SuperPred、TCMSP数据库分别预测了苦参碱的49、161、10个潜在靶点,整合后得到苦参碱的潜在靶点208个。

2.2 葡萄膜黑色素瘤相关基因构建及韦恩图绘制

从GeneCards、OMIM、CTD和DrugBank数据库中下载疾病相关靶点,通过删除重复值后共获得5 453个疾病相关靶点,见图1a。将苦参碱与葡萄膜黑色素瘤靶点取交集之后,共获得120个交集靶点基因并绘制韦恩图,见图1b。



a:葡萄膜黑色素瘤相关靶点;b:苦参碱与葡萄膜黑色素瘤相关靶点的韦恩图

图1 葡萄膜黑色素瘤相关基因构建及韦恩图绘制

2.3 PPI网络构建

将2.2中筛选得到的120个交集靶点导入STRING 12.0蛋白质相互作用信息数据库进行筛选。将相关信息导入Cytoscape 3.9.0软件,构建PPI网络,包括113个节点和921条边,见图2。以度值为节点筛选度值较高的前8位基因靶点,其中白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)、髓细胞增生蛋白(myelocytomatosis proteins, MYC)、信号转导及转录激活蛋白3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)、胱天蛋白酶3(caspase-3, CASP3)、热休克蛋白90AB1(heat shock protein 90AB1, HSP90AB1)、哺乳动物雷帕霉素

靶蛋白(mammalian target of rapamycin,mTOR)、基质金属蛋白酶9(matrix metalloproteinase 9,MMP9)的度值分别为63、61、58、56、55、46、44、44。

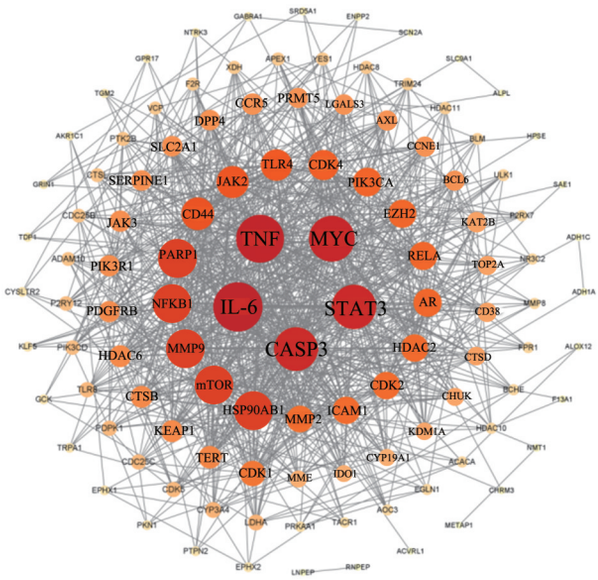


图2 PPI网络图(随着度值的升高,节点图形越大,颜色越深)

2.4 “药物-靶点-疾病”网络图的构建

利用Cytoscape 3.9.0软件对120个潜在靶点进行分析,构建“药物-靶点-疾病”相互作用网络图,包括122个节点和240条边,见图3。

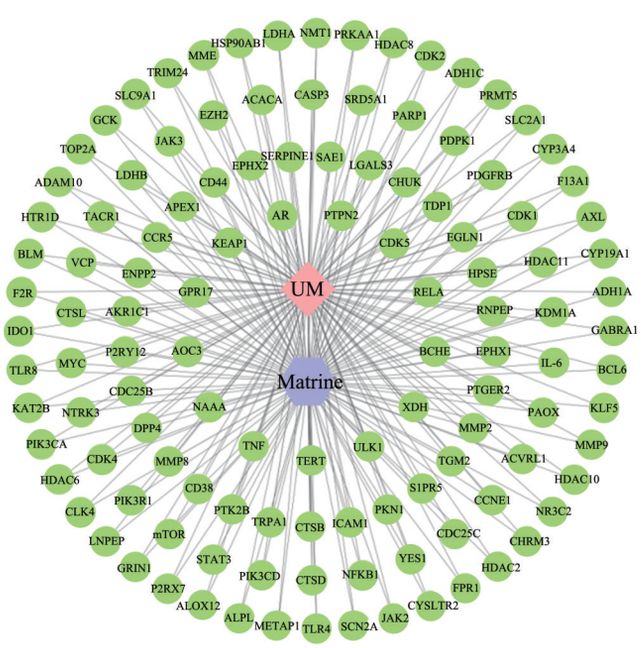


图3 “药物-靶点-疾病”网络图

2.5 GO功能和KEGG信号通路富集分析

通过DAVID数据库进行GO功能富集分析,设定参考值P<0.05,以P值排前20位的条目作图,共筛选出426个条目。其中生物过程(biologyical process,BP)条目343个(80.5%)、细胞组分(cellular component,CC)条目63个(14.8%)、分子功能(molecular function,MF)条目20个(4.7%)。BP主要包括炎症反应、蛋白质磷酸化和对外源性刺激的反应等;CC主要包括质膜、细胞表面和细胞质等;MF主要包括相同蛋白质结合、ATP结合及激酶活性等。通过DAVID数据库进行KEGG信号通路富集分析,设定参考值P<0.05,以P值排前20位的条目作图,共筛选出138个条目,结果显示,苦参碱的作用是由病毒致癌机理、癌症通路、TNF信号通路和PI3K-Akt信号通路介导的,见图4。

2.6 分子对接

苦参碱与蛋白IL-6、TNF、MYC、STAT3、CASP3、HSP90AB1、mTOR和MMP9结合的最佳结合能为-6.5、-8.4、-6.4、-6.3、-6.6、-8.3、-9.7、-8.0 kcal/mol;苦参碱可以与以上蛋白结合,且苦参碱与蛋白mTOR的结合能力较强(结合能绝对值越高,表明结合越稳定)。结合位点见图5。

2.7 不同浓度苦参碱对MuM2B细胞的影响

浓度为0.50 g/L、1.00 g/L、2.00 g/L的苦参碱能够抑制MuM2B细胞的增殖,且随着浓度的增加,细胞存活率逐渐降低,见图6。

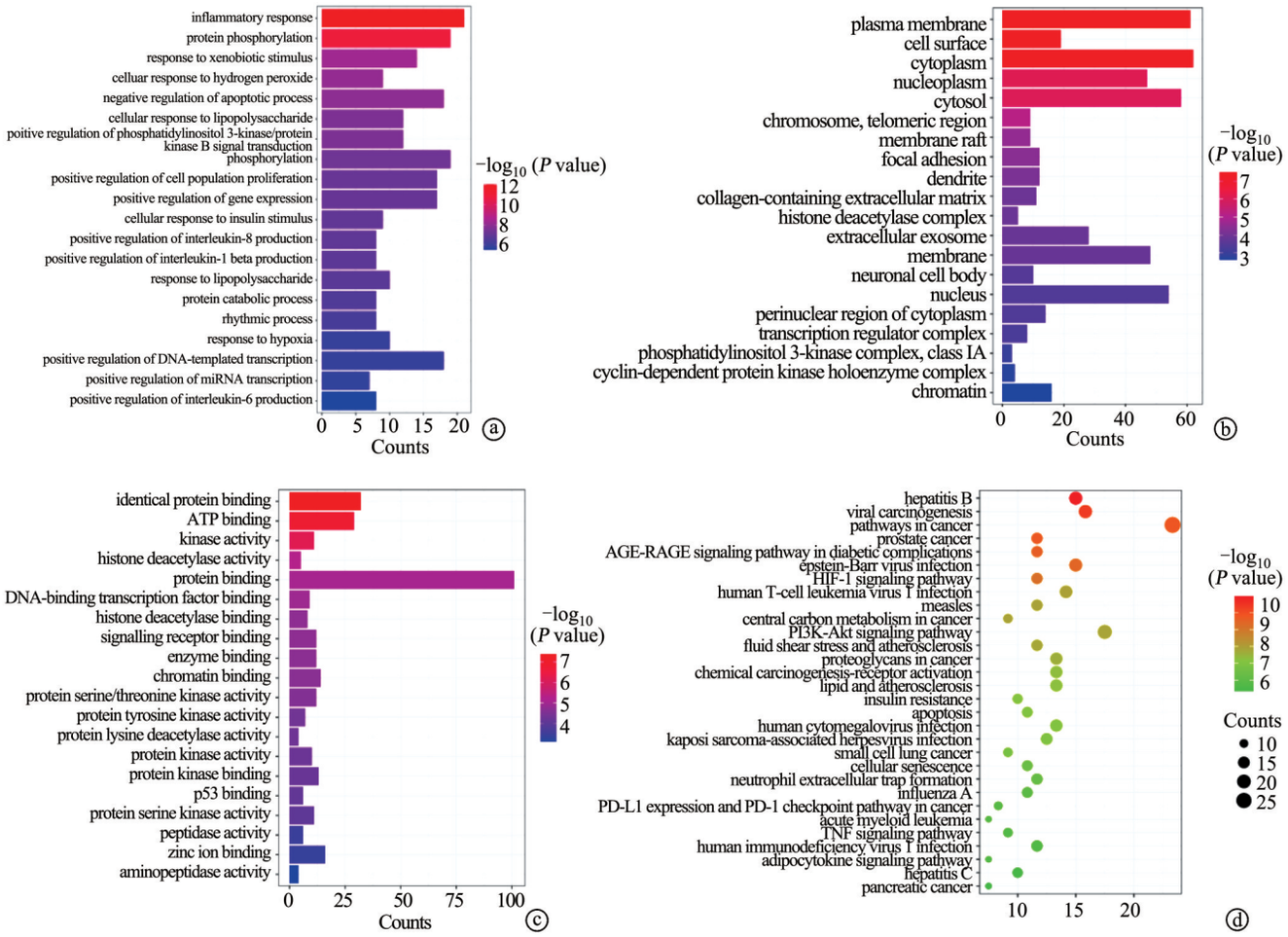
2.8 不同浓度苦参碱对MuM2B细胞p-PI3K和p-Akt蛋白表达水平的影响

Western blot法结果显示,浓度为0.50 g/L、1.00 g/L、2.00 g/L的苦参碱可以下调p-PI3K和p-Akt的蛋白表达水平,且随着浓度的增加,p-PI3K和p-Akt的蛋白表达水平逐渐下降,见图7。

3 讨论

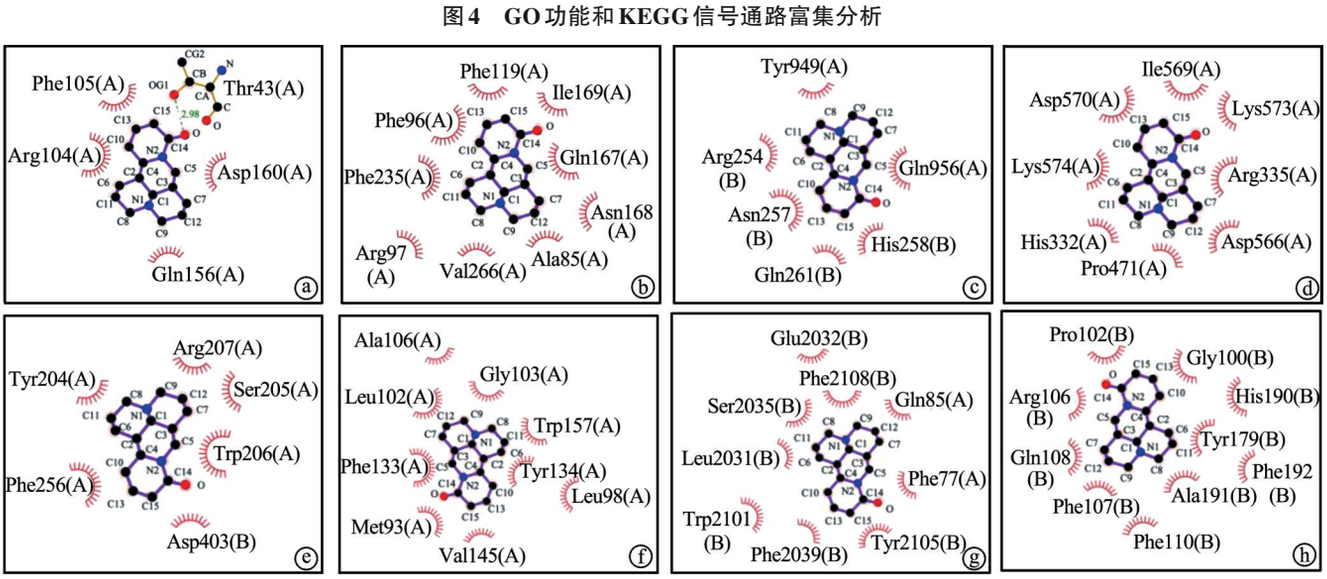
葡萄膜黑色素瘤是成人常见的眼内恶性肿瘤,具有非常强的转移侵袭能力,且转移后预后极差。其治疗方法众多,但均具有一定的局限性。近年来研究发现,天然化合物不仅可以有效抑制肿瘤的发生发展,而且不良反应较小。其中苦参碱是由豆科植物苦参的干燥根、植株、果实经乙醇等有机溶剂提取制成的一种生物碱,具有良好的抗炎抗氧化以及抗肿瘤的作用,对葡萄膜黑色素瘤有一定的治疗效果。因此,本研究通过网络药理学探索苦参碱在葡萄膜黑色素瘤中的潜在作用靶点和机制,并通过分子对接技术及细胞实验进行验证,以期为后期的机制研究提供依据。

从Swiss Target Prediction、SuperPred、TCMSP数据库中筛选了208个苦参碱的潜在靶点,从GeneCards、OMIM、CTD以及DrugBank数据库获得了5 453个疾病相关靶点,共鉴定出120个苦参碱-葡萄膜黑色素瘤相关靶点。基于PPI网络中的度值,获得了8个核心靶



a:BP;b:CC;c:MF;d:KEGG通路分析

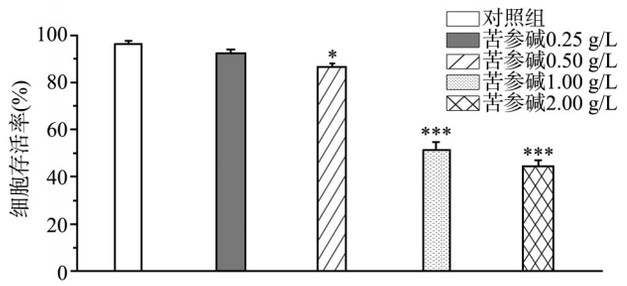
图4 GO功能和KEGG信号通路富集分析



a:IL-6;b:TNF;c:MYC;d:STAT3;e:CASP3;f:HSP90AB1;g:mTOR;h:MMP9

图5 苦参碱与核心靶点的对接模式

点。其中,IL-6作为趋化因子家族成员之一,是一种重要的细胞因子,广泛参与免疫反应、炎症反应以及多种生理过程的调节。Gong等[6]研究发现免疫逃逸在葡萄膜黑色素瘤患者的早期转移中起着重要作用,而IL-6驱动的自分泌乳酸可介导这一免疫逃逸过程。TNF是一种自然免疫和获得性免疫的负调节因子,在维持免疫稳态方面发挥关键作用;Liu等[7]研究证明TNF、IL-6等细胞因子的表达水平增高,与葡萄膜黑色

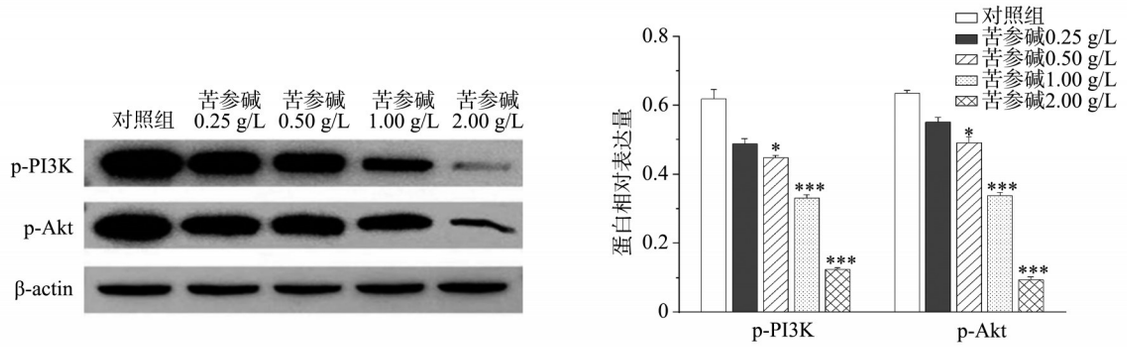


*:与对照组比较,$P<0.05$;***:与对照组比较,$P<0.001$

图6 不同浓度苦参碱对细胞存活率的影响

素瘤患者生存率下降具有相关性;Bai等[8]也得出相似结论,并认为TNF-α是一种潜在的新型泛癌免疫检查点。MMP9是一种重要的酶,属于基质金属蛋白酶家族,具有降解细胞外基质的能力。Wang等[9]通过生物信息学方法发现,与正常组织相比,葡萄膜黑色素瘤组织中MMP1、MMP9、MMP10、MMP11、MMP13、MMP14和MMP17的转录水平上调,这一发现为葡萄膜黑色素瘤的治疗提供了潜在的生物标志物和靶点;Shatruk等[10]通过免疫组织染色的方法证明了葡萄膜黑色素瘤组织中与细胞外基质降解相关的MMP9与基质金属蛋白酶抑制因子-1(tissue inhibitor of metalloproteinases-1,TIMP-1)蛋白水平较高。MYC主要调节细胞生长、增殖、分化、细胞周期、代谢、存活、凋亡以及肿瘤发生。多项研究表明,MYC与葡萄膜黑色素瘤细胞的增殖、凋亡和侵袭相关。Zhang等[11]发现,与正常组织相比,脉络膜黑色素瘤组织中的HDAC7过度表达,HDAC7的上调促进了脉络膜黑色素瘤细胞的增殖和转移,而HDAC7的促癌作用是由c-MYC介导的。STAT3作为细胞凋亡与增殖平衡的主要调节因子,在细胞信号转导中起着重要作用。Krishna等[12]通过对40例转移性葡萄膜黑色素瘤样本进行转录组学分析,发现STAT3等有助于免疫抑制细胞因子表达上调。Dai等[13]也证明了细胞外基质重塑会激活跨膜受体酪氨酸激酶(一种DDR1配体),进而调控DDR1-STAT3级联促进葡萄膜黑色素瘤肝转移定植。CASP3是细胞凋亡的关键因子之一,其被凋亡细胞中的CASP8、CASP9、CASP10通过外源和内源性途径直接激活,从而引发细胞凋亡。研究发现许多药物可能通过CASP3这一关键靶点诱导葡萄膜黑色素瘤细胞焦亡。Jiu等[14]发现白皮杉醇在葡萄膜黑色素瘤中的抗肿瘤特性就是通过激活CASP3/GSDME这一焦亡相关信号传导实现的;Yi等[15]发现局部麻醉剂盐酸丁卡因也可以通过CASP3/GSDME通路诱导葡萄膜黑色素瘤细胞焦亡;Che等[16]指出小白菊内酯呈剂量依赖性抑制人葡萄膜黑色素瘤细胞的活力,降低细胞周期蛋白D1表达的同时,增加了CASP3、CASP9等表达。HSP90AB1作为热休克蛋白家族成员之一,目前已经成为许多癌症治疗的新靶标[17]。mTOR作为一类重要的蛋白质物质,参与调节许多重要的细胞过程,包括翻译、转录、自噬。国内外研究发现mTOR参与介导葡萄膜黑色素瘤的增殖、侵袭和转移过程,并发挥重要作用。李柯等[18]发现敲低miR-19表达可抑制葡萄膜黑色素瘤细胞增殖、迁移和侵袭并促进凋亡,其机制可能与EGFR/Akt/mTOR信号通路被抑制有关。魏丽等[19]发现miR-127-3p通过靶向下调MAPK4来抑制葡萄膜黑色素瘤细胞增殖、迁移和侵袭,诱导细胞凋亡,这可能与抑制Akt/mTOR通路激活有关。Dewaele等[20]指出mTOR抑制可以增强葡萄膜黑色素瘤细胞中反义寡核苷酸的递送和活性,介导生存相关线粒体黑色素瘤特异性致癌非编码RNA沉默,并进一步降低葡萄膜黑色素瘤细胞活力。总之,这些靶点主要涉及葡萄膜黑色素瘤患者的细胞增殖、凋亡及转移,也验证了网络药理学结果的准确性。唐伟智等[21]通过网络药理学探究苦参碱的抗肿瘤机制,得到靶蛋白76个,其中MYC和CASP3与本研究结果一致。

KEGG信号通路富集结果表明,这些核心靶点在病毒致癌机理、癌症通路、TNF信号通路和PI3K-Akt信号通路显著富集。近年来,大量研究发现PI3K-Akt信号通路在葡萄膜黑色素瘤的细胞增殖、凋亡及预后



*:与对照组比较,$P<0.05$;***:与对照组比较,$P<0.001$

图7 不同浓度苦参碱对细胞p-PI3K和p-Akt表达水平的影响

方面发挥着重要的调节作用,包括PI3K/Akt/mTOR途径和PI3K/Akt/MMP9途径[22-24]。基于以上预测结果,本研究进行细胞实验验证,结果显示,苦参碱可以下调p-PI3K和p-Akt的蛋白表达水平,抑制PI3K-Akt信号通路,符合GO富集分析和KEGG信号通路富集分析结果,表明苦参碱可通过下调该信号通路,进而抑制细胞增殖,促进细胞凋亡。

综上所述,网络药理学表明,苦参碱可能作用于IL-6、TNF、MYC、STAT3、CASP3、HSP90AB1、mTOR和MMP9等关键靶点,通过病毒致癌机理、癌症通路、TNF信号通路和PI3K-Akt信号通路发挥治疗葡萄膜黑色素瘤的作用,一个关键靶点可能调控多个通路,多个靶点也许同时调控一个通路,药物、核心靶点及信号通路之间存在复杂的网络关系。分子对接显示,苦参碱与这些关键靶点之间具有良好的结合能力。本研究从细胞水平初步验证了苦参碱治疗葡萄膜黑色素瘤的基本药理作用和相关机制,后续还需进行动物实验,进一步明确苦参碱治疗葡萄膜黑色素瘤的机制。

[参考文献]

[1] Wespiser M, Neidhardt E, Négrier S. Uveal melanoma: in the era of new treatments [J]. Cancer Treat Rev, 2023, 119: 102599. doi: 10.1016/j.ctrv.2023.102599.

[2] Spagnolo F, Caltabiano G, Queirolo P. Uveal melanoma [J]. Cancer Treat Rev, 200, 38(5): 549-553. doi: 10.1016/j.ctrv.2012.01.002.

[3] Hamza M, Abdullatif AM, Hamza HS, et al. Uveal melanoma management: a recent review of the literature [J]. Egyptian Retina Journal, 2025, 11(1): 9-12. doi: 10.4103/erj.erj_11_24.

[4] 庞盼杏,宁 蓉,祝 创,等. 苦参碱缩氨基脲类化合物的合成及其体外抗肿瘤活性研究[J]. 有机化学,2023,43(6):2126-2135. doi:10.6023/cjoc202209040.

[5] 王振华,郭小奇,陈利军,等. 苦参碱对葡萄膜黑色素瘤细胞增殖、凋亡及放射敏感性的影响[J]. 中华眼底病杂志,2023,39(10):828-835. doi:10.3760/cma.j.cn511434-20230907-00377.

[6] Gong C, Yang M, Long H, et al. Erratum in: IL-6-driven autocrine lactate promotes immune escape of uveal melanoma [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2024, 65(4): 41. doi: 10.1167/iovs.65.4.41.

[7] Liu Y, Huang Y, Zhao C, et al. The roles of genetic mutation and cytokines/chemokines in immune response and their association with uveal melanoma patient outcome [J]. Heliyon, 2024, 10(18): 56-62. doi: 10.1016/j.heliyon.2024.e37852.

[8] Bai KH, Zhang YY, Li XP, et al. Comprehensive analysis of tumor necrosis factor-α-inducible protein 8-like 2 (TIPE2): a potential novel pan-cancer immune checkpoint [J]. Comput Struct Biotechnol, 2022, 17(20): 5226-5234. doi: 10.1016/j.csbj.2022.09.021.

[9] Wang T, Zhang Y, Bai J, et al. MMP1 and MMP9 are potential prognostic biomarkers and targets for uveal melanoma [J]. BMC Cancer, 2021, 21(1): 1068. doi: 10.1186/s12885-021-08788-3.

[10] Shatruk AY, Bgatova NP, Yeremina AV, et al. Expression of markers associated with epithelial-mesenchymal transition and extracellular matrix degradation in human uveal melanoma [J]. Bull Exp Biol Med, 2024, 177(6): 774-779. doi: 10.1007/s10517-024-06266-x.

[11] Zhang Y, Ding P, Wang Y, et al. HDAC7/c-Myc signaling pathway promotes the proliferation and metastasis of choroidal melanoma cells [J]. Cell Death Dis, 2023, 14(1): 38. doi: 10.1038/s41419-022-05522-0.

[12] Krishna Y, Acha-Sagredo A, Sabat-Pośpiech D, et al. Transcriptome profiling reveals new insights into the immune microenvironment and upregulation of novel biomarkers in metastatic uveal melanoma [J]. Cancers (Basel), 2020, 12(10): 2832. doi: 10.3390/cancers12102832.

[13] Dai W, Liu S, Wang S, et al. Activation of transmembrane receptor tyrosine kinase DDR1-STAT3 cascade by extracellular matrix remodeling promotes liver metastatic colonization in uveal melanoma [J]. Signal Transduct Target Ther, 2021, 6(1): 176. doi: 10.1038/s41392-021-00563-x.

[14] Jiu X, Li W, Liu Y, et al. A critical activator of pyroptosis, mediates the anti-tumor effects of piceatannol in uveal melanoma cells via caspase 3/GSDME pathway [J]. Int J Mol Med, 2024, 54(5): 96. doi: 10.3892/ijmm.2024.5420.

[15] Yi P, Zhang R, Qin Z, et al. Local anesthetic tetracaine hydrochloride induces pyroptosis via caspase-3/gasdermin E in uveal melanoma [J]. Biomed Pharmacother, 2024, 180(15): 117471. doi: 10.1016/j.biopha.2024.117471.

[16] Che ST, Bie L, Li X, et al. Parthenolide inhibits the proliferation and induces the apoptosis of human uveal melanoma cells [J]. Int J Ophthalmol, 2019, 12(10): 1531-1538. doi: 10.18240/ijo.2019.10.03.

[17] Haase M, Fitze G. HSP90AB1: helping the good and the bad [J]. Gene, 2016, 575(1): 171-186. doi: 10.1016/j.gene.

[18] 李 珂,项 奕. miRNA-19对葡萄膜黑色素瘤细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭的影响及其机制研究[J]. 眼科新进展,2021,41(5):413-416. doi:10.13389/j.cnki.rao.2021.0086

[19] 魏 丽,连红梅,刘 鹏,等. MiR-127-3p靶向MAPK4对葡萄膜黑色素瘤细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭的影响[J]. 中山大学学报(医学科学版),2020,41(1):76-85. doi:10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2020.0012.

[20] Dewaele S, Delhaye L, Paepe B, et al. mTOR inhibition enhances delivery and activity of antisense oligonucleotides in uveal melanoma cells [J]. Nucleic Acid Ther, 2023, 33(4): 248-264. doi: 10.1089/nat.2023.0008.

[21] 唐伟智,侯恩存. 基于网络药理学及分子对接探讨苦参碱抗肿瘤机制[J]. 亚太传统医药,2019,15(7):173-177. doi:10.11954/ytctyy.201907058.

[22] Pérez-Pérez M, Agostino A, de Sola-Llamas CG, et al. Next-generation sequencing of uveal melanoma with clinical and histological correlations: prognostic value of new mutations in the PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. Clin Exp Ophthalmol, 2023, 51(8): 822-834. doi: 10.1111/ceo.14302.

[23] 程 英. MicroRNA-222介导PI3K/Akt/MMP-9信号通路参与调控HMGA1对葡萄膜黑色素瘤生物学功能的影响[D]. 山东:山东大学,2020. doi:10.27272/d.cnki.gshdu.2020.000423.

[24] Geng Y, Geng Y, Liu X, et al. PI3K/AKT/mTOR pathway-derived risk score exhibits correlation with immune infiltration in uveal melanoma patients [J]. Front Oncol, 2023, 20(13): 1167930. doi: 10.3389/fonc.2023.1167930.

(编辑:贺绍梅)